

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель Министра

Б.Н.Андросюк

2023 г.

Регистрационный № 001-0123



**Метод лечения пациентов с рефрактерными и рецидивными формами
CD19-позитивных лейкозов и лимфом с применением анти-CD19 CAR T-
клеток человека**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр детской онкологии,
гематологии и иммунологии», государственное учреждение
«Республиканский научно-практический центр онкологии и
медицинской радиологии им. Н.Н.Александрова».

АВТОРЫ: Лукойко Е.С., Каленик О.А., к.б.н. Шман Т.В., к.б.н.
Мелешко А.Н., к.б.н. Дорошенко Т.М., Мигас А.А., Северин И.Н.,
Саврицкая А.С., Клыч А.В., д.м.н., доцент Портянко А.С., д.м.н.,
профессор Конопля Н.Е., к.м.н., доцент Пролесковская И.В.

Минск, 2023

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

CAR	– химерный антигенный рецептор;
ССВО	– синдром системного воспалительного ответа;
РТПХ	– реакция «трансплантат против хозяина»;
ВИЧ	– вирус иммунодефицита человека;
АСТ	– аспартатаминотрансфераза;
АЛТ	– аланинаминотрансфераза;
УФ	– ультрафиолет;
DPBS	– фосфатно-солевой буфер в модификации Дульбекко;
ИЛ	– интерлейкин;
CD	– кластер дифференцировки;
ЭДТА	– этилендиаминтетрауксусная кислота;
HEPES	– 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота.

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод лечения рефрактерных и рецидивных форм CD19-позитивных лейкозов и лимфом у детей старше 6 месяцев и взрослых, с применением анти-CD19 CAR T-клеток человека, полученных путем генетической модификации Т-лимфоцитов методом лентивирусной трансдукции с дальнейшей экспансией в культуре *ex vivo*.

Инструкция может быть использована в комплексе медицинских услуг, направленных на лечение пациентов с рефрактерными и рецидивными формами CD19-позитивных лейкозов (C91) и лимфом (C82-C83, C85). Метод, изложенный в настоящей инструкции, предназначен для врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам со злокачественными новообразованиями в условиях стационара (республиканский уровень оказания медицинской помощи).

1. ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, РЕАКТИВОВ И РАСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ

- Ламинарный шкаф 2В класса защиты;
- инкубатор углекислотный;
- микроскоп лабораторный прямого света;
- центрифуга настольная;
- проточный цитофлюориметр;
- дозатор серологический;
- набор микропипеток автоматических;
- холодильник двухкамерный с морозильной камерой;
- вихревой лабораторный смеситель;
- камера Горяева;
- автоклав;
- автоматическая система микробиологического контроля;
- устройство для иммуномагнитной селекции клеток;

- базальная среда питательная с L-глутамином и HEPES в составе;
- эмбриональная телячья сыворотка, инактивированная;
- фосфатный-солевой буфер Дульбекко, стерильный;
- рекомбинантный человеческий интерлейкин-7 (ИЛ7);
- рекомбинантный человеческий интерлейкин-15 (ИЛ15);
- частицы для активации/экспансии Т-клеток;
- набор для позитивной иммуномагнитной селекции CD4⁺ популяции Т-клеток;
- набор для позитивной иммуномагнитной селекции CD8⁺-популяции Т-клеток;
- рекомбинантные псевдотипированные лентивирусные частицы, кодирующие экспрессионную кассету с CAR к белку CD19 человека, а также репортерный белок hEGFRt;
- ретронектин;
- раствор трипанового синего 0,5%;
- раствор уксусной кислоты 3% с добавлением метиленового синего;
- стерильный раствор хлорида натрия 0,9%;
- раствор ЭДТА 0,5М стерильный;
- флуоресцентно-меченные моноклональные антитела для проточной цитометрии к поверхностным клеточным антигенам человека CD3, CD4, CD8, hEGFRt;
- пробирки стерильные центрифужные объемом 15 и 50 мл;
- наконечники для дозаторов (объемом от 0,1 до 1000 мкл);
- наконечники для автоматических серологических пипеток объемом от 1 до 25 мл;
- планшеты культуральные 6-луночные без дополнительной обработки;
- флаконы культуральные с вентилируемой крышкой с площадью ростовой поверхности 25 см² без дополнительной обработки;

- флаконы культуральные с вентилируемой крышкой с площадью ростовой поверхности 175 см² без дополнительной обработки;
- флаконы для автоматических микробиологических анализаторов гемокультур;
- пробирки полистироловые объемом 5 мл;
- система трансфузионная без латекса и лейкоцитарного фильтра.

2. ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Рефрактерные формы и рецидивы CD19-положительных острых лимфобластных лейкозов (C91) и рецидивирующих или рефрактерных лимфом (C82-C83, C85) у детей старше 6 месяцев и взрослых.

3. ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

- Первичный иммунодефицит;
- первично-множественные злокачественные опухоли;
- сопутствующие генетические синдромы, сопровождающиеся нарушением работы костного мозга (анемия Фанкони, синдром Костмана, синдром Швахмана-Даймонда и др.). Синдром Дауна не является противопоказанием для введения CAR-T клеток.
- трансфузия донорских лимфоцитов пациенту в срок менее 6 недель до планируемого введения клеточного продукта;
- заболевания нервной системы, сопровождающиеся тяжелым неврологическим дефицитом;
- активная инфекция (бактериальная, вирусная, грибковая) на момент планируемого введения CAR-T клеток. Клеточный продукт может быть введен через 72 часа при улучшении состояния пациента;
- РТПХ II-IV степени, после перенесенной ранее ТГСК;
- ВИЧ- инфекция, сифилис, активный гепатит В, С;

- тяжелое общее состояние пациента (индекс Карновского/Ланского менее 50%);
- сердечная сосудистая недостаточность II-III степени;
- выраженное нарушение функции печени (общий билирубин > 3 -х возрастных норм и/или трансаминазы (аланинаминотрансфераза (АЛТ) и аспартатаминотрансфераза (АСТ) > 5 возрастных норм;
- выраженное нарушение функции почек (уровень креатинина превышает верхнюю границу нормы в 3 раза и более);
- дыхательная недостаточность (сатурация на атмосферном воздухе менее 90%);
- детский возраст младше 6 месяцев;
- беременность;
- психические заболевания или социальные особенности, которые не могут обеспечить соблюдение пациентом всех условий протокола лечения и/или могут угрожать его здоровью;
- социально-экономические или географические обстоятельства, которые не могут гарантировать должное соблюдение требований протокола лечению и дальнейшему наблюдению.

4. ТЕХНОЛОГИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Метод лечения рефрактерных и рецидивных форм CD19-позитивных лейкозов и лимфом с использованием анти-CD19 CAR T-клеток включает несколько этапов (Рисунок 1):

- получение CAR T-клеток;
- проведение кондиционирования и профилактика осложнений;
- введение CAR T-клеток;
- наблюдение и мониторинг эффективности процедуры после введения CAR T-клеток.

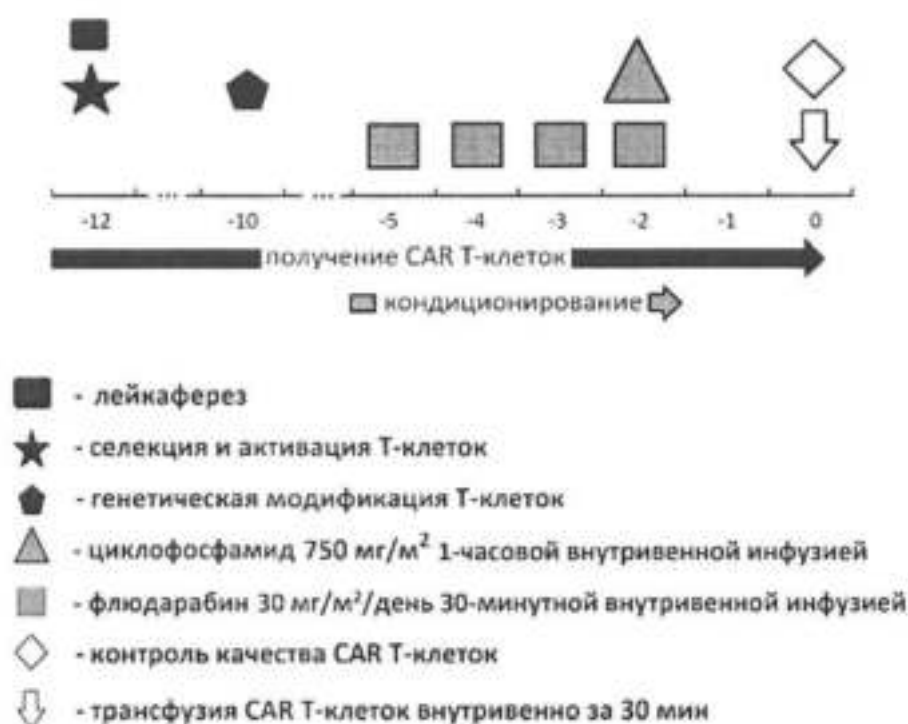


Рисунок 1 – Схема этапов метода лечения пациентов с рефрактерными и рецидивными формами CD19-позитивных лейкозов и лимфом с использованием анти-CD19 CAR T-клеток

4.1 ПРОЦЕДУРА ПОЛУЧЕНИЯ АНТИ-CD19 CAR Т-КЛЕТОК

4.1.1 Подготовка помещения и оборудования

Перед началом работы проводят влажную обработку пола, стен, мебели и оборудования боксового помещения с использованием дезинфицирующих средств и стерильных салфеток. Производят обработку помещения с использованием УФ-излучателя в течение 1 часа.

4.1.2 Подготовка питательных сред и растворов

4.1.2.1 Приготовление полной ростовой среды для Т-клеток. Для получения 1 единицы анти-CD19 CAR Т-клеток (1×10^6 клеток/кг массы реципиента) готовят 1100 мл полной ростовой среды (2 флакона по 550 мл). Для этого маркируют флаконы (идентификационные данные пациента и дата

приготовления). В маркированные флаконы стерильными наконечниками вносят 500 мл базальной ростовой среды (с HEPES и L-глутамином в составе), 50 мл эмбриональной телячьей сыворотки, перемешивают пипетированием и помещают в холодильник на +4°C до дальнейшего использования. Перед использованием флакон со полной ростовой средой нагревают до 37°C в термостате. Рекомбинантные цитокины ИЛ7 и ИЛ15 добавляют непосредственно к суспензии клеток до конечной концентрации 10 нг/мл.

4.1.2.2 Приготовление отмывочного буфера (ОБ) для селекции Т-клеток. Для получения 1 единицы анти-CD19 CAR Т-клеток (1×10^6 клеток/кг массы реципиента) готовят 510 мл буфера ОБ. Для этого маркируют флакон с буфером ОБ (идентификационные данные пациента и дата приготовления). В маркированный флакон вносят 500 мл буфера DPBS, 10 мл эмбриональной телячьей сыворотки, 200 мкл 0,5М раствора ЭДТА, перемешивают пипетированием и помещают в холодильник на +4°C до дальнейшего использования.

4.1.3 Получение анти-CD19 CAR Т-клеток

4.1.3.1 Получение первичной культуры Т-клеток

4.1.3.1.1 Получение первичной культуры Т-клеток осуществляют из материала лейкофереза. Для получения одной единицы анти-CD19 CAR Т-клеток требуется продукт лейкофереза в количестве не менее 1×10^9 клеток с содержанием CD3 клеток не менее 20%. Процедура лейкофереза осуществляется в отделении трансфузиологии в стерильную тару. 0,5 мл продукта лейкофереза используют для посева на питательные среды с целью контроля микробной контаминации (п. 4.1.3.3.1).

4.1.3.1.2 Продукт лейкофереза переносят в стерильные центрифужные пробирки объемом 50 мл и осаждают клетки центрифугированием при 400g/10 мин/4°C.

4.1.3.1.3 Надосадочную жидкость отбирают серологической пипеткой, а осадок клеток дважды отмывают в буфере DPBS центрифугированием при 400g/10 мин/40°C.

4.1.3.1.4 Полученные осадки ресуспендируют в 5 мл буфера ОБ, переносят в одну пробирку и производят подсчет клеток в камере Горяева с использованием 3% раствора уксусной кислоты.

4.1.3.1.5 В две новые стерильные центрифужные пробирки объемом 50 мл переносят клеточную суспензию в количестве по 150×10^6 клеток и доводят буфером ОБ до конечного объема 15 мл. Пробирки маркируют с указанием популяции селектируемых клеток «CD4», либо «CD8».

4.1.3.1.6 В маркированные пробирки с клеточной суспензией вносят магнитные частицы из соответствующих наборов для иммуномагнитной селекции Т-клеток, перемешивают полученную суспензию с использованием лабораторного вихревого смесителя и инкубируют при 4°C и периодическом перемешивании в течение 20 минут.

4.1.3.1.7 Пробирки помещают в устройство для иммуномагнитной селекции клеток на 2 минуты.

4.1.3.1.8 Используя серологическую пипетку, аккуратно удаляют супернатант не извлекая пробирки из устройства для иммуномагнитной селекции клеток.

4.1.3.1.9 Извлекают пробирки из устройства для иммуномагнитной селекции клеток и вносят по 15 мл буфера ОБ. Ресуспендируют комплексы магнитных частиц с клетками пипетированием и помещают пробирки в устройство для иммуномагнитной селекции клеток на 2 минуты.

4.1.3.1.10 Повторить пункты 4.1.3.1.7 – 4.1.3.1.9 еще 2 раза.

4.1.3.1.11 Комплексы магнитных частиц с клетками ресуспендируют пипетированием в 1,5 мл базальной питательной среды с добавлением 15 мкл эмбриональной телячьей сыворотки.

4.1.3.1.12 К полученной суспензии добавляют реагент для удаления магнитных частиц с поверхности клеток и инкубируют 45 мин при

комнатной температуре периодически перемешивая встряхиванием содержимое пробирок.

4.1.3.1.13 В пробирки с клеточной суспензией вносят по 15 мл полной ростовой среды для Т-клеток и помещают в устройство для иммуномагнитной селекции клеток на 2 минуты.

4.1.3.1.14 Не извлекая пробирки из устройства для иммуномагнитной селекции клеток, серологической пипеткой отбирают супернатант, содержащий целевую популяцию Т-клеток и переносят в новые стерильные маркированные пробирки объемом 50 мл.

4.1.3.1.15 Осаждают клетки, полученные на предыдущей стадии, центрифугированием при 400g/10 мин/4°C.

4.1.3.1.16 Удаляют супернатант с использованием серологической пипетки, а клеточные осадки ресуспендируют пипетированием в 5 мл полной ростовой среды для Т-клеток.

4.1.3.1.17 Производят подсчет и оценку жизнеспособности селектированных клеток с использованием 0,5% раствора трипанового синего в камере Горяева.

4.1.3.1.18 Вносят по 1×10^7 селектированных CD4 и CD8 Т-клеток в маркированные соответствующим образом культуральные флаконы 25см² и доводят объем до 5 мл полной ростовой средой для Т-клеток.

4.1.3.1.19 Непосредственно во флаконы добавляют к суспензии клеток по 50 нг рекомбинантных человеческих цитокинов ИЛ7 и ИЛ15.

4.1.3.1.20 Непосредственно во флаконы с клеточной суспензией вносят частицы для активации/экспансии Т-клеток.

4.1.3.1.21 Помещают клеточные культуры в углекислотный инкубатор на 48 часов.

4.1.3.2 Генетическая модификация и накопление биомассы анти-CD19 CAR T-клеток

Активированные T-клетки, полученные на этапе 3.1 используют для генетической модификации методом лентивирусной трансдукции с дальнейшей экспансией анти-CD19 CAR T-клеток.

4.1.3.2.1 За 2 часа до начала трансдукции T-клеток в 2 лунки 6-луночного планшета вносят по 40 мкг ретронектина. Содержимое лунок доводят буфером DPBS до конечного объема 3 мл. Инкубируют плашку при комнатной температуре в течение 2 часов.

4.1.3.2.2 Спустя 2 часа с использованием серологической пипетки аккуратно отбирают жидкость из лунок с ретронектином и вносят по 3 мл буфера ОБ. Оставляют при комнатной температуре на 30 мин.

4.1.3.2.3 Производят подсчет и оценку жизнеспособности T-клеток с использованием 0,5% раствора трипанового синего в камере Горяева.

4.1.3.2.4 Спустя 30 мин инкубации, из покрытых ретронектином лунок аккуратно с использованием серологической пипетки отбирают супернатант и вносят в предварительно промаркированные («CD4» и «CD8») лунки по 5×10^6 T-клеток из соответствующих культур.

4.1.3.2.5 В лунки с суспензией клеток вносят лентивирусные частицы с экспрессионной кассетой, кодирующей анти-CD19 CAR и репортерный белок hEGFRt, из расчета 5×10^7 трансдуцирующих единиц на лунку. Объемы клеточной суспензии в лунках доводят полной ростовой средой для T-клеток до 3 мл.

4.1.3.2.6 Планшет с клеточными культурами центрифугируют при 600g/90 мин/32°C.

4.1.3.2.7 После центрифугирования планшет с T-клетками помещают в углекислотный инкубатор на 16 часов.

4.1.3.2.8 Спустя 16 часов с использованием серологических пипеток отбирают из лунок клеточные суспензии и переносят в стерильные пробирки

объемом 50 мл. Доводят полной ростовой средой для Т-клеток объемы в пробирках до 20 мл и центрифугируют при 400g/10 мин/к.т.

4.1.3.2.9 Из пробирок отбирают супернатанты с использованием серологических пипеток, а осадки клеток ресуспендируют пипетированием в 5 мл полной ростовой среды для Т-клеток.

4.1.3.2.10 Производят подсчет и оценку жизнеспособности Т-клеток с использованием 0,5% раствора трипанового синего в камере Горяева.

4.1.3.2.11 Переносят клеточные суспензии в предварительно промаркированные культуральные флаконы с площадью ростовой поверхности 175 см² и доводят полной ростовой средой для Т-клеток до концентрации 0,3x10⁶ клеток/мл. Следует учитывать, что рабочий диапазон объемов для флаконов с площадью ростовой поверхности 175 см² составляет 30-50 мл.

4.1.3.2.12 Добавляют к культурам клеток рекомбинантные цитокины ИЛ7 и ИЛ15 до конечной концентрации 10 нг/мл каждого и помещают флаконы в углекислотный инкубатор на 72 часа.

4.1.3.2.13 Спустя 72 часа содержимое флаконов переносят серологической пипеткой в новые, предварительно промаркированные, стерильные центрифужные пробирки объемом 50 мл.

4.1.3.2.14 Осаждают клетки центрифугированием при 400g/10 мин/23⁰С.

4.1.3.2.15 Удаляют супернатанты с использованием серологических пипеток, а осадки ресуспендируют пипетированием в 5 мл полной ростовой среды для Т-клеток.

4.1.3.2.16 Производят подсчет и оценку жизнеспособности Т-клеток с использованием 0,5% раствора трипанового синего в камере Горяева.

4.1.3.2.17 Переносят клеточные суспензии в предварительно промаркированные 175 см² культуральные флаконы и доводят полной ростовой средой для Т-клеток до концентрации 0,3x10⁶ клеток/мл.

4.1.3.2.18 Добавляют к культурам клеток рекомбинантные цитокины ИЛ7 и ИЛ15 до конечной концентрации 10 нг/мл каждого и помещают флаконы в углекислотный инкубатор на 96 часов.

4.1.3.2.19 Спустя 96 часов производят подсчет и оценку жизнеспособности Т-клеток с использованием 0,5% раствора трипанового синего в камере Горяева.

4.1.3.2.20 Доводят полной ростовой средой для Т-клеток концентрацию клеточной суспензии до $0,3 \times 10^6$ клеток/мл. Вносят рекомбинантные цитокины ИЛ7 и ИЛ15 до конечной концентрации 10 нг/мл каждого.

4.1.3.2.21 При необходимости, культуры рассаживают в дополнительные флаконы. Флаконы помещают в углекислотный инкубатор на 72 часа.

4.1.3.2.22 Спустя 72 часа производится упаковка и маркировка анти-CD19 CAR Т-клеток, а также контроль качества в соответствии со стадией 3.3.

4.1.3.3 Контроль качества

4.1.3.3.1 Для выявления возможной контаминации аэробными и анаэробными микроорганизмами материала лейкофереза используют автоматическую систему микробиологического контроля. Для проведения анализа используют 0,5 мл клеточной суспензии материала лейкофереза, которую вносят с использованием шприца объемом 1 мл во флаконы для гемокультур в асептических условиях. Анализ проводят в соответствии с протоколом производителя автоматической системы микробиологического контроля.

4.1.3.3.2 Для выявления возможной контаминации аэробными и анаэробными микроорганизмами анти-CD19 CAR Т-клеток используют автоматическую систему микробиологического контроля. Для проведения анализа используют 0,5 мл клеточной суспензии конечного клеточного продукта анти-CD19 CAR Т-клеток, которую вносят с использованием

шприца объемом 1 мл во флаконы для гемокультур в асептических условиях. Анализ проводят в соответствии с протоколом производителя автоматической системы микробиологического контроля.

4.1.3.3.3 Иммунофенотипический анализ клеточных продуктов CD4 и CD8 анти-CD19 CAR T-клеток осуществляют методом проточной цитометрии. Исследования выполняют на проточном цитофлуориметре с использованием моноклональных флуоресцентно-меченных антител к белкам человека CD3, CD4, CD8, CD45, CD19, hEGFRt. Для каждого образца анализируют не менее 10^5 клеток конечного продукта. Исследования включают: оценку чистоты конечного продукта (содержание CD45+CD3+CD4+ и CD45+CD3+CD8+ клеток в соответствующих клеточных продуктах не менее 99%, отсутствие CD45+CD19+ клеток), оценку содержания анти-CD19 CAR T-клеток в конечном продукте (популяция T-клеток, с эктопической экспрессией репортерного белка hEGFRt).

4.2 МЕДИЦИНСКАЯ ПРОФИЛАКТИКА СИНДРОМА ЛИЗИСА ОПУХОЛИ

Профилактика синдрома лизиса стартует за 48 часов до начала кондиционирования и проводится в течение 14 дней после проведения трансфузии клеточного продукта. Профилактика синдрома лизиса включает: инфузионную терапию, контроль баланса жидкости, аллопуриноловую профилактику, мониторинг электролитов, мочевой кислоты и функции почек.

Аллопуринол вводится в дозе 10 мг/кг в сутки в 2-3 приема (максимальная доза – 500 мг/сутки) в течение 14 дней от начала кондиционирования.

Параметры инфузионной терапии:

- объем = 3000-5000 мл/м²/сутки;
- 5% раствор глюкозы с 0,9% раствором NaCl = 1 : 1;
- инициальная инфузия - без калия. Однако, в дальнейшем коррекция электролитов в соответствии с данными биохимических анализов;

- защелачивание мочи проводят с использованием 60 мМ раствора NaHCO_3 в 0,9% растворе NaCl путем постоянного внутривенного введения;
- регулирование необходимого объема NaHCO_3 соответственно pH мочи.

4.3 КОНДИЦИОНИРОВАНИЕ

Для лучшей персистенции анти-CD19 CAR T-клеток *in vivo* на момент введения CAR T-клеток пациент должен находиться в цитопении. Поэтому введение CAR T-клеток проводят после проведения блока кондиционирования:

- флюдарабин в суммарной дозе 120 мг/м^2 (30 мг/м^2 в дни -5, -4, -3, -2), каждое введение внутривенно капельно за 30 минут;
- циклофосфамид 750 мг/м^2 за 48 часов до введения клеточного продукта, введение внутривенно капельно за 1 час.

4.4 МЕДИЦИНСКАЯ ПРОФИЛАКТИКА СИНДРОМА ВЫСВОБОЖДЕНИЯ ЦИТОКИНОВ

С целью медицинской профилактики синдрома высвобождения цитокинов, за 1 час до введения клеточного продукта вводится тоцилизумаб однократно в дозе 8 мг/кг (максимальная доза - 800 мг) внутривенно капельно за 1 час.

4.5 ПРОЦЕДУРА ТРАНСФУЗИИ АНТИ-CD19 CAR T-КЛЕТОК

Введение анти-CD19 CAR T-клеток проводится не ранее, чем через 48 часов после последнего введения химиопрепаратов.

Критерии соответствия состояния пациента для проведения инфузии CAR-T:

- комплаентность пациента и подписанное информированное согласие на введение клеточного продукта;

- отсутствие активной неконтролируемой системной инфекции и ССВО, включая бактериальные, грибковые и вирусные инфекции, либо улучшение по инфекционному статусу должно быть достигнуто за 72 часа до запланированной инфузии CAR-T;
- отрицательный ПЦР-тест на коронавирус и отрицательный результат иммунофлюоресцентным методом исследования на респираторную группу вирусов;
- стабильное общее состояние пациента (Индекс Карновского/Ланского более 50%);
- сатурация на атмосферном воздухе выше 90%;
- УЗИ сердца: ФВ левого желудочка в пределах 55-70%; ФУ левого желудочка в пределах 20-35%. Отсутствие аритмии, нестабильной стенокардии;
- в общем анализе крови уровень тромбоцитов $\geq 50,0 \times 10^9$ /л., уровень гемоглобина ≥ 100 г/л;
- сохранение диуреза, креатинин не превышает 2 возрастные нормы, клиренс по эндогенному креатинину ≥ 30 мл/мин/1.73 м²;
- отсутствие гипотонии с поддержкой вазопрессоров;

С целью динамического мониторинга возможного развития острых инфузионных реакций связанные с биологической активностью клеточного продукта, введение клеточного продукта должно осуществляться в условиях отделения интенсивной терапии и реанимации (ОИТР).

Клеточный продукт вводится однократно, непосредственно после завершения цикла производства, в виде титрования внутривенной инфузии за 30 минут. Введение осуществляется через систему для внутривенных инфузий. В составе материала, из которого изготовлена система для внутривенных введений, должен отсутствовать латекс, а также отсутствовать лейкоцитарный фильтр.

4.6 МЕДИЦИНСКАЯ ПРОФИЛАКТИКА НЕЙРОТОКСИЧНОСТИ

С целью диагностики нейротоксичности проводится ежедневный осмотр невролога. Для медицинской профилактики нейротоксичности назначается леветирацетам в дозе 10 мг / кг (максимальная доза 500 мг) каждые 12 часов в течение 30 дней после инфузии клеточного продукта.

4.7 НАБЛЮДЕНИЕ И МОНИТОРИНГ ЭФФЕКТИВНОСТИ ПРОЦЕДУРЫ ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ CAR T-КЛЕТОК

4.7.1 Лабораторный мониторинг пациентов в период от даты трансфузии клеточного продукта до + 28 дня включает:

- контроль общего анализа крови с формулой осуществляется ежедневно, начиная с курса лимфодеплецирующей терапии до восстановления показателей нейтрофилов;
- биохимический анализ крови с контролем электролитов (включая Ca, Mg, P, мочевую кислоту) осуществляется ежедневно, начиная с курса лимфодеплецирующей терапии до нормализации показателей крови;
- определение уровня IgG в периферической крови 1 раз в неделю начиная со дня трансфузии клеточного продукта до восстановления показателей гемопоэза и нормализации уровня IgG в периферической крови;
- коагулограмма (включая определения ПДФ и Д-димеров) осуществляется каждые 3 дня начиная со дня трансфузии клеточного продукта до восстановления показателей гемопоэза;
- определение уровня прокальцитонина осуществляется 1 раз в 3 дня, начиная со дня трансфузии клеточного продукта до восстановления показателей гемопоэза;
- цитокиновый профиль (ИЛ-2R, ИЛ-6) сыворотки крови определяется в дни 0, +3, +5, +7, +10. При подозрении CRS ежедневно до нормализации уровней;

- определение CD19-положительных клеток в периферической крови определяется на +3, +7, +10, +14, +21, +28 дни трансфузии клеточного продукта;
- мониторинг персистенции CAR-T в периферической крови определяется на +3, +7, +10, +14, +21, +28 дни трансфузии клеточного продукта;
- общий анализ мочи выполняется 1 раз в 3 дня, начиная со дня трансфузии клеточного продукта;
- морфологическое исследование ликвора (цитоспин) выполняется на +14, +28 дни трансфузии клеточного продукта;
- исследование ликвора методом ПЦР к CMV, ВПГ 1.2.6 тип, ВЭБ выполняется на +14, +28 дни трансфузии клеточного продукта;
- миелограмма выполняется на +14, +28 дни трансфузии клеточного продукта;
- определение показателей МОБ (методом ИФТ, реаранжировок генов Ig/TCR, ПЦР химерных онкогенов (при их наличии) +14, +28 дни трансфузии клеточного продукта;
- мониторинг персистенции CAR-T в костном мозге выполняется на +14, +28 дни трансфузии клеточного продукта;
- исследование периферической крови методом ПЦР к CMV, ВПГ 1,2,6 тип, ВЭБ выполняется в день трансфузии клеточного продукта, +7, +14, +21, +28 дни трансфузии клеточного продукта;
- скрининговые бактериологические посевы выполняются в день трансфузии клеточного продукта в последующем каждые 7 дней до выхода из нейтропении;
- УЗИ локусов поражения (при наличии очагов внекостномозгового поражения) выполняется на +14, +28 день от даты трансфузии клеточного продукта;

- КТ/МРТ локусов поражения (при наличии очагов внекостномозгового поражения) выполняется на +14, +28 день от даты трансфузии клеточного продукта;
- МРТ всего тела и/или ПЭТ-КТ всего тела (при наличии очагов внекостномозгового поражения) выполняется на +28 день от даты трансфузии клеточного продукта.

4.7.2 лабораторный мониторинг через 3, 6, 9, 12 месяцев от даты трансфузии клеточного продукта включает:

- контроль общего анализа крови с формулой;
- развернутый биохимический анализ крови;
- определение уровня IgG в периферической крови;
- коагулограмма (включая определения ПДФ и Д-димеров);
- иммунограмма;
- мониторинг персистенции CAR-T в периферической крови при условии их выявления на предыдущей контрольной точке;
- морфологическое исследование ликвора (цитоспин);
- мониторинг персистенции CAR-T в ликворе, при условии их выявления на предыдущей контрольной точке;
- миелограмма;
- определение показателей МОБ (методом ИФТ, реаранжировок генов Ig/TCR, ПЦР химерных онкогенов (при их наличии);
- исследование периферической крови методом ПЦР к CMV, ВПГ 1,2,6 тип, ВЭБ;
- УЗИ локусов поражения (при наличии очагов внекостномозгового поражения);
- КТ/МРТ локусов поражения (при наличии очагов внекостномозгового поражения);

- ПЭТ-КТ всего тела (при наличии очагов внекостномозгового поражения) выполняется через 6 и 12 мес.

4.8 ВОЗМОЖНЫЕ ОШИБКИ И ОСЛОЖНЕНИЯ

Описаны проблемы, которые могут возникнуть при выполнении метода с описанием причин возникновения и путей их устранения (см. Таблица 1).

Таблица 1 - Возможные ошибки при получении анти-CD19 CAR T-клеток и пути их устранения

Проблема	Возможная причина	Пути устранения
Низкая жизнеспособность материала лейкофереза	Несоблюдение норм забора и транспортировки материала лейкофереза	Забор материала должен осуществляться в отделении трансфузиологии в стерильную тару, содержащую антикоагулянт, длительность хранения при транспортировке не более 6 часов при температуре от +4 до +25°C
	Неподходящий pH растворов для отмывки клеток	pH должна быть в диапазоне 7,2–7,4
	Грубые механические манипуляции с клетками	Избегать чрезмерно активного пипетирования образцов со вспениванием, длительного центрифугирования
Низкая жизнеспособность Т-клеток при пассировании	Неподходящий pH растворов для отмывки клеток	pH должна быть в диапазоне 7,2–7,4
	Цитотоксическое действие питательной среды	Использовать качественные растворы, тестированные для использования с культурами клеток
	Температура среды и растворов чрезмерно низкая	Использовать среды и растворы, прогретые до комнатной температуры
	Грубые механические манипуляции с клетками	Избегать чрезмерно активного пипетирования образцов со вспениванием, длительного центрифугирования
Низкая эффективность генетической модификации Т-клеток	Недостаточная активация Т-клеток на момент трансдукции	Строго следовать протоколу активации, описанному производителем активационных частиц
	Низкий функциональный титр рекомбинантных лентивирусных частиц	Соблюдать режим хранения и транспортировки рекомбинантных лентивирусных частиц
Наличие признаков микробиологической контаминации анти-CD19 CAR T-клеточного продукта	Контаминация питательных сред и растворов, используемых в процессе пассирования	Использовать качественные растворы, тестированные для использования с культурами клеток
	Контаминация культуральной посуды и расходных материалов	Использовать только стерильную лабораторную посуду и расходные материалы на этапах пассирования клеточной культуры
	Контаминация рабочих поверхностей и помещения	Систематическая уборка помещения бокса и ламинарного шкафа с асептическими средствами, стерилизация дозаторов и микропипеток, используемых для стерильных работ